



Universidade Federal da Paraíba

Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional - CTDR

Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira – DTS

Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Ana Caroline Silva Braz

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Melo Resende.

Novembro de 2016



Universidade Federal da Paraíba

Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional - CTDR

Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira – DTS

Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Ana Caroline Silva Braz

Trabalho de Conclusão do *Curso Superior de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira* do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba, apresentado como requisito para obtenção do Grau de Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira.

**Orientador: Prof. Dr. Fábio de Melo
Resende**

Novembro de 2016

B827e Braz, Ana Caroline Silva.

Estudo da fermentação do bagaço de cana para obtenção de etanol de segunda geração. [recurso eletrônico] / Ana Caroline Silva Braz. -- 2016.

43 p.: il. color. + CD.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Orientador: Dr. Fábio de Melo Resende.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Tecnologia em Produção Sucroalcooleira) – CTDR/UFPB.

1. Bioetanol. 2. Etanol 2G. 3. Material lignocelulósico. 4. Saccharomyces cerevisiae. 5. Fermentação. I. Resende, Fábio de Melo. II. Título.

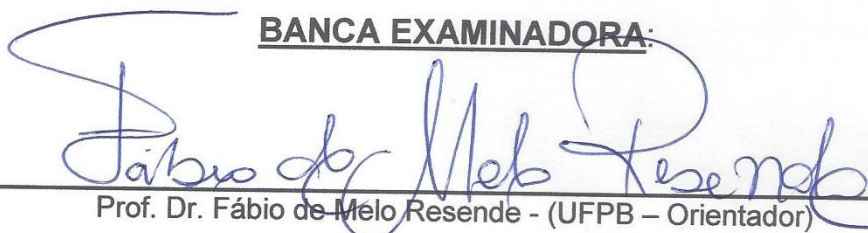
CDU: 604.2:661.722(043.2)

ANA CAROLINE SILVA BRAZ

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA
PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

TCC aprovado em 23/11/16 como requisito para a conclusão do curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Fábio de Melo Resende - (UFPB – Orientador)


Prof^a. Dr^a Márcia Helena Pontieri - (UFPB – Membro interno)


Prof^a Dr^a Erika Adriana de Santana Gomes – (UFPB – Membro interno)

João Pessoa-PB

2016

Dedico a Deus, ao meu pai André Lúcio da Costa Braz, a minha mãe Etelma Maria Silva Braz, ao meu irmão, aos meus avós e a todos que estiveram ligados direta ou indiretamente que vieram a contribuir com a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada é possível.

A minha mãe Etelma Maria da Silva Braz e ao meu irmão André Lúcio da Costa Braz Filho por todo apoio e confiança depositada.

Aos meus amigos de universidade Renner Ribeiro, Luan Maia, Amanda Gisele, Sarah Ingrid, Elton Santos, Maíra, Pablyano Rodrigues, Grace Kelly, Erick Apanamaran por toda força e torcida dedicada.

A Cleberson Guedes por toda paciência e pelas palavras de incentivo enviadas.

A todo corpo docente do Departamento de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira por tudo que foi passado e me fizeram crescer profissionalmente no decorrer do curso.

A Diego Batista por toda assistência dada durante os dias que estive no laboratório.

Ao professor Dr, Fábio de Melo Resende pelas portas que me ajudou a abrir para que hoje eu chegasse onde estou com todo conhecimento por ele dado.

E em especial ao meu pai André Lúcio da Costa Braz por está ao meu lado desde a escolha do curso e acreditar que tudo daria certo, me incentivando e encorajando a bater de frente com todas as dificuldades que apareceram, com palavras de força, coragem, e, acima de tudo, palavras de amor.

RESUMO

Nas últimas décadas, a busca e o desenvolvimento de tecnologias eficientes e de baixo custo tendo em vista a produção do bioetanol é constante. O uso da hidrólise para conversão dos carboidratos presentes em materiais lignocelulósicos é uma alternativa para obtenção de tal produto. Este processo é mais difícil que os métodos convencionais, uma vez que, é preciso produzir o açúcar através da hidrólise da matéria-prima, além de ser necessário um pré-tratamento físico ou químico a fim de preparar a biomassa, tornando-a acessível para a etapa química ou biológica posterior. Este trabalho tem como objetivo a avaliação da aeração no mosto fermentado do bagaço de cana, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de produzir etanol de segunda geração. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em um béquer com água destilada e ácido sulfúrico foi adicionado bagaço de cana, em seguida, a mistura foi submetida à agitação e banho Maria por duas horas, sendo esta a etapa de hidrólise ácida. Antes de avançar para a segunda etapa do processo, a biomassa passou pelo processo de filtração a vácuo, em sequência, na fração líquida obtida foi adicionado hidróxido de sódio para correção do pH, tornando o meio próprio para a levedura escolhida, para este trabalho foi a levedura selecionada LNF CA-11, a qual foi ativada por aeração. Na etapa de fermentação, na qual ocorre à transformação do açúcar obtido em álcool, inicialmente foram preparados dois mostos, onde, apenas um destes foi submetida a injeção de ar. No início do processo fermentativo os mostos 1 e 2 tinham as concentrações de ART em 3,23 e 3,28 g/L , consecutivos. A quantificação foi feita pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico) com espectrofotômetro. Os melhores resultados foram obtidos no mosto que foi submetido à aeração, no quais a eficiência média foi de 42,37 %, uma vez que no mosto sem aeração os resultados de eficiência foram de 17,4%. Concluindo, então, que a levedura se adaptou melhor ao mosto com injeção de ar. Em trabalhos futuros, pretende-se utilizar outras leveduras para auxiliar na fermentação, visando uma maior eficiência, uma vez que, a *Saccharomyces cerevisiae* só fermenta açúcares C6.

Palavras-chaves: bioetanol, material lignocelulósico, fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol 2G.

ABSTRACT

In the last decades, the search for and development of efficient and low-cost technologies for the production of bioethanol is constant. The use of the hydrolysis to convert the carbohydrates present in lignocellulosic materials is an alternative to obtain such product. This process is more difficult than conventional methods, since it is necessary to produce the sugar through the hydrolysis of the raw material, besides a physical or chemical pretreatment is necessary in order to prepare the biomass, making it accessible for The subsequent chemical or biological step. This work has the objective of evaluating the aeration of cane bagasse fermentation using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in order to produce second generation ethanol. The experiments were performed in triplicate. In a beaker with distilled water and sulfuric acid was added sugarcane bagasse, then the mixture was submitted to stirring and water bath for two hours, this being the acid hydrolysis step. Before proceeding to the second step of the process, the biomass underwent the vacuum filtration process, in sequence, in the liquid fraction obtained was added sodium hydroxide for pH correction, making the proper medium for the yeast chosen, for this work was The selected yeast LNF CA-11, which was activated by aeration. In the fermentation stage, in which the sugar obtained in alcohol occurs, two musts were initially prepared, where only one of them was subjected to air injection. At the beginning of the fermentation process musts 1 and 2 had the ART concentrations at 3.23 and 3.28 g / L, consecutive. Quantification was done using the DNS method (dinitrosalicylic acid) with spectrophotometer. The best results were obtained in the wort that was submitted to aeration, in which the average efficiency was 42.37%, since in the wort without aeration the efficiency results were 17.4%. Concluding, then, that the yeast was better adapted to the must with air injection. In future works, it is intended to use other yeasts to assist in the fermentation, aiming at a greater efficiency, since *Saccharomyces cerevisiae* only ferments C6 sugars.

Keywords: bioethanol, lignocellulosic material, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, 2G ethanol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1.OBJETIVOS	14
1.1.1. Objetivo Geral	14
1.1.2. Objetivos Específicos.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Etanol	16
2.1.1. Etanol Convencional (Primeira Geração).....	17
2.1.2. Etanol Lignocelulósico (Segunda Geração)	17
2.1.3. Etanol de Terceira Geração	18
2.2. Hidrólise.....	18
2.2.1. Hidrólise da Celulose	19
2.2.2. Parâmetros e Fatores Primordiais para uma Boa Hidrólise Ácida	20
2.3. Método DNS para Identificação dos Açúcares Redutores	21
2.4. Fermentação Alcoólica	22
2.4.1. Breve Histórico	22
2.4.2. Agente da Fermentação Alcoólica	23
2.4.3. Principais produtos da fermentação	23
2.4.4. Cuidados necessários na fermentação	24
2.4.5. Fases da fermentação.....	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1. Bagaço de Cana	27
3.2. Pré-tratamento	28
3.3. Hidrólise.....	28
3.4. Concentração ART	29
3.4.1. Determinação da curva padrão	30
3.4.2. Análise das amostras.....	32

3.5.	Filtração a vácuo	33
3.6.	Correção do pH	34
3.7.	Preparo do inoculo	34
3.8.	Fermentação	35
3.9.	Destilação	36
4.	RESULTADOS E DISCURSSÕES	37
4.1.	Concentração de ART	37
4.2.	Álcool produzido	39
5.	CONCLUSÃO	41
6.	SUGESTÕES FUTURAS	42
7.	REFERÊNCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas da celulose.	20
Figura 2 - Esquema das reações envolvidas no Método DNS	22
Figura 3 - Peneira quantitativa (1 mm)	26
Figura 4 - Pesagem do bagaço.	27
Figura 5 - Pré-hidrólise.	28
Figura 6 – Sistema adaptado para reação de hidrólise.	29
Figura 7 - Etapa inicial método DNS.	30
Figura 8 - Solução-mãe junto com o DNS.	31
Figura 9 - Espectrofotômetro para análise das amostras.	31
Figura 10 - Curva padrão para método DNS.	32
Figura 11 - Aquecimento dos tubos com amostras de biomassa.	33
Figura 12 - Sistema de filtração a vácuo.	33
Figura 13 - Sistema de correção do pH.	34
Figura 14 - Aeração do inóculo.	35
Figura 15 - Etapa de fermentação. Mosto I: sem injeção de ar. Mosto II: com injeção de ar.	36
Figura 16 - Densímetro digital portátil	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas.	24
Tabela 2 - Resultados de leitura de absorbância.	37
Tabela 3 - Concentração de açúcares em g/L.....	38
Tabela 4 - Comparativo da fermentação considerando o açúcar consumido...	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Combustível.

ART – Açúcares Redutores Totais

ATP – Adenosina trisfato

2 G – Segunda geração

3 G – Terceira geração

C 5 – Açúcares com cinco carbonos

C 6 – Açúcares com seis carbonos

DNS – Ácido dinitrosalicílico

Proálcool – Programa Nacional de Álcool.

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energia cresce cada vez mais em virtude da preocupação com o desenvolvimento sustentável. Uma vez que, os combustíveis fósseis tendem a se esgotar gradativamente e, além disso, emitem uma quantidade significativa de gases poluentes na etapa de combustão dos motores.

No Brasil, a cana-de-açúcar é utilizada para produzir todo o etanol do país (ANP 2016). Porém, a usina sucroalcooleira ainda é uma grande geradora de resíduos, dentre eles o bagaço de cana resultante da moagem. Nesta etapa, caldo e fibra são separados. O caldo permanece no processo para produção de etanol, enquanto a fibra (bagaço de cana) é utilizada para alimentar as caldeiras e gerar energia para a usina. Entretanto, o quantitativo de bagaço utilizado para geração de energia é bem inferior ao que é gerado, é necessário, portanto, um novo destino para o bagaço excedente.

Ramalho et al (2012) aponta que o bioetanol pode ser fabricado a partir de diversas fontes de carboidratos em suas diferentes formas. E que, a depender de sua complexidade as matérias prima para a produção de etanol podem ser classificadas em três: açucaradas, como a cana de açúcar e seus derivados; matérias primas amiláceas que são ricas em amido, como a mandioca, batata doce, milho, arroz, dentre outras; e matérias primas lignocelulósicas, ou seja, a biomassa dos materiais vegetais rica em celulose.

O bagaço é composto por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero de cadeia longa, formada por um único monômero: a glicose. A hemicelulose é um polissacarídeo constituído por hexoses, pentoses e ácidos urônicos. A lignina é um composto aromático formado pela polimerização de alguns álcoois e é responsável pela rigidez dos tecidos vegetais (CANILHA et al., 2012).

Portanto, a utilização do bagaço de cana para obtenção de bioetanol é uma alternativa viável e ideal para a reutilização desse resíduo. Todavia, a rota tecnológica para obtenção desse combustível se diferencia da tradicional, uma vez que, são necessárias outras etapas anteriores à fermentação com o objetivo de separar os açúcares da fibra. Com isso, o etanol obtido a partir de fontes lignocelulósicas é chamado etanol de segunda geração.

De acordo com Raízen (2014) na fabricação do etanol de segunda geração, os resíduos lignocelulósicos passam por um pré-tratamento, no qual as fibras são desestruturadas e, depois, são transformadas em açúcares solúveis por meio de processo chamado hidrólise.

As dificuldades nas etapas de produção refletem em um número cada vez maior de estudos que buscam as melhores rotas para obtenção desse etanol.

Nessa pesquisa, a etapa estudada foi a fermentação alcoólica, sendo esta a fase onde os açúcares são convertidos em álcool através da ação de uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Foram avaliadas dois mostos para a levedura: um com aeração mecânica e outro sem aeração. Com o objetivo de identificar em qual dos dois, o desempenho da levedura e o rendimento de álcool seriam maiores.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito da aeração mecânica durante a etapa da fermentação alcoólica para obtenção de etanol de segunda geração.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Realizar a hidrólise ácida na biomassa da cana;
- Corrigir o pH do líquido a ser fermentado;
- Acompanhar o processo fermentativo da biomassa;
- Obter etanol de segunda geração;
- Realizar estudos comparativos entre mosto aerado e mosto não aerado;
- e
- Calcular o consumo de açúcar em os ambos os casos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

De acordo com Kohlhepp (2010) os combustíveis vêm sendo centro das atenções nacionais e internacionais, devido ao aumento do preço petróleo e a preocupação com as emissões de CO₂.

A elevação do preço do petróleo na década de 70, fez com que os olhares se voltassem à biomassa, pois a mesma foi considerada economicamente viável e satisfatória tanto para demanda de energia como fonte de combustível para motores alternativos veiculares. Entretanto, com a restabilização do preço do petróleo em 1985 o interesse em novas ou redescobertas de fontes de fornecimento energético e combustível reduziu de forma significativa.

Contudo, nos anos 90, a busca por desenvolver tecnologias avançadas de transformações leva de volta ao cenário a biomassa como fonte para energia e combustível. Além dos fatores econômicos são inclusos também o menor impacto ambiental e sua capacidade de se renovar.

Com o passar dos anos novas pesquisas foram surgindo e métodos antigos foram melhorados. A busca por fontes renováveis para combustíveis, porém economicamente viáveis é constante. Com isso, o etanol de segunda geração surge como uma grande alternativa, uma vez que, o aproveitamento da cana passa a ser integral. Aumentando a produção de etanol sem a necessidade de aumento no cultivo, pois a matéria prima utilizada é o bagaço ou a palha da cana, resíduo proveniente da própria cana de açúcar.

Segundo Xavier (2007) entre os anos de 1975 e 2000, a modernização da produção de cana por hectare aumentou em 33%, consequentemente o rendimento de etanol a partir da mesma aumentou 14%.

As matérias-primas de natureza lignocelulósica resultantes do processo de obtenção de álcool e açúcar possuem características essenciais capazes de gerar etanol, através da hidrólise das mesmas, seguidas de uma fermentação e destilação (Nova Cana, 2014).

Como no processo de etanol convencional na etapa de fermentação deve-se ter uma atenção maior por se tratar de uma fase microbiológica. E ser a etapa crucial da transformação do açúcar em álcool. Portanto, parâmetros

como acidez, temperatura e agitação devem ser bem acompanhados para que o máximo de açúcar presente no mosto seja transformado em álcool.

2.1. Etanol

De acordo com a Lei Nº 12.490 de 16 de setembro de 2011, etanol é um biocombustível líquido derivado de biomassa renovável, que tem como principal componente o álcool etílico, que pode ser utilizado, diretamente ou mediante alterações, em motores a combustão interna com ignição por centelha, em outras formas de geração de energia ou em indústria petroquímica, podendo ser obtido por rotas tecnológicas distintas, conforme especificado em regulamento.

O etanol vindo da cana de açúcar passou a ser misturado de maneira obrigatória na gasolina desde 1931, a princípio em 5% de etanol anidro em relação ao volume de gasolina, no intuito de reduzir a dependência em combustíveis fósseis e compactar a produção excedente de açúcar.

Contudo em 1975 com a criação do Programa Nacional de Álcool (Proálcool) o incentivo para uso do etanol aumentou significativamente. Muitos desses incentivos estabeleceram níveis mínimos para a mistura etanol-gasolina utilizados nos veículos, alcançando 25% de etanol anidro. Também incentivou o uso de etanol hidratado puro como combustível. Todavia, em 1985, com o declínio do preço do barril de petróleo o programa perdeu força (PERLINGEIRO, 2014). Algumas medidas de emergência foram tomadas, como a redução da quantidade de etanol na mistura e o uso da mistura metanol-gasolina.

Na década de 1990 começaram a ocorrer importantes mudanças administrativas no setor sucroalcooleiro. Com o lançamento dos carros flex-fuel em 2003, que representa 95% das vendas de novos veículos (ANFAVEA, 2012), o setor sucroalcooleiro ganhou novas forças com o aumento do consumo de etanol.

Atualmente a produção de etanol ganhou força, principalmente, devido à preocupação com o ambiente. Com isso a busca por novas fontes de matéria prima para este biocombustível tem se tornado cada vez maior. A natureza da matéria prima e o processo de transformação pelo qual irá passar até produzir

etanol determina a geração desse biocombustível. Os estudos recentes apontam o etanol com três gerações: primeira geração (etanol convencional vindo da cana-de-açúcar), segunda geração (etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos) e terceira geração (produzido através da hidrólise de microalgas).

2.1.1. Etanol Convencional (Primeira Geração)

No Brasil, para a produção do etanol convencional (etanol de primeira geração) a matéria prima utilizada é a cana-de-açúcar, por ser rica em açúcares, mais simples e produtiva.

Na produção, a cana é levada e direcionada a um processo de separação. Inicialmente será picada, desfibrada e então direcionada a moagem onde ocorre a separação entre caldo e fibra. O bagaço resultante dessa separação é levado para a caldeira, onde será utilizado como fonte de energia para a fábrica. Já o caldo passa por uma etapa de tratamento (peneiramento, decantação, aquecimento, entre outros) a fim de retirar a maior parte das impurezas que possam vir a interferir na fermentação. A fermentação consiste em uma etapa microbiológica, onde leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) se alimentam do açúcar presente no caldo e produzem álcool, o produto dessa fase é chamado mosto fermentado. Por fim, este mosto é enviado para a torre de destilação, e em um processo de aquecimento os vapores alcoólicos serão separados dos vapores de água, produzindo assim o etanol.

2.1.2. Etanol Lignocelulósico (Segunda Geração)

Cerca de 50% da biomassa terrestre é composta por materiais lignocelulósicos.

O termo lignocelulose está relacionado à parte da planta que forma a parede celular (lamela, paredes primária e secundária), composta de estruturas fibrosas, basicamente constituídas por polissacarídeos como a celulose (40-60%) e hemicelulose (20-40%). Estes compostos são associados a uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas denominadas lignina (15-25%) (SUN E CHENG, 2002).

Em sua composição este material apresenta valores glicosídeos, que são os açúcares.

No Brasil os resíduos lignocelulósicos mais comuns são bagaço e palha da cana. Estima-se que o setor sucroalcooleiro brasileiro seja responsável pela geração de, aproximadamente, 166 milhões de toneladas de bagaço, sendo que deste total, 18,7 milhões de toneladas são excedentes (Conab, 2011). Sendo assim, é possível praticamente duplicar a produção de etanol sem a necessidade de expandir a área agrícola.

Para produzir etanol a partir desse tipo de material são necessárias tecnologias diferentes. Para iniciar o processo é utilizado um pré-tratamento, seja ele físico, físico-químico, químico ou biológico, seguido de um processo de hidrólise da hemicelulose e celulose, a fim de separar seus principais componentes. A hidrólise pode ser ácida, alcalina ou enzimática. Após esta etapa a biomassa está pronta para ser fermentada e destilada assim como ocorre no processo de obtenção do etanol convencional.

2.1.3. Etanol de Terceira Geração

Segundo Perlingeiro (2014), como na produção de etanol de segunda geração, para produzir o etanol 3G é preciso disponibilizar os açúcares que compõem a estrutura da microalga. Sendo assim, as etapas de pré-tratamento e hidrólise se fazem necessárias e essenciais para produção do álcool. Esses tratamentos podem ser químicos, físico-químicos ou enzimáticos. A fermentação e a destilação ocorrem da mesma maneira que no processo convencional, porém as leveduras utilizadas nos processos de 2G e 3G podem ser mudadas, uma vez que a matéria prima possui carbonos C5, não fermentados pela *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Hidrólise

Do grego *hidrolysis* (*hidro*: água; *lysis*: separação), a hidrólise é uma reação química de quebra de molécula, na qual a água realiza uma dupla troca com outro composto, conforme mostrado a seguir na equação (1):



Para produção de etanol de segunda geração os processos de hidrólise utilizados são por meio ácido, enzimático ou alcalino, sendo este último raramente usado devido ao rendimento muito inferior em comparação aos outros processos. Neste trabalho foi utilizada a hidrólise ácida com ácido diluído para quebra das moléculas e disponibilização dos açúcares devido ao menor custo e rendimento satisfatório.

O maior interesse na pesquisa em hidrólise ácida diluída é o resultado que esse processo é economicamente mais favorável para a produção de bioetanol, visto que ele é baseado em baixo consumo de ácido o que diminui os custos de matéria prima e equipamentos devido à menor corrosividade do processo (GURGEL, 2002).

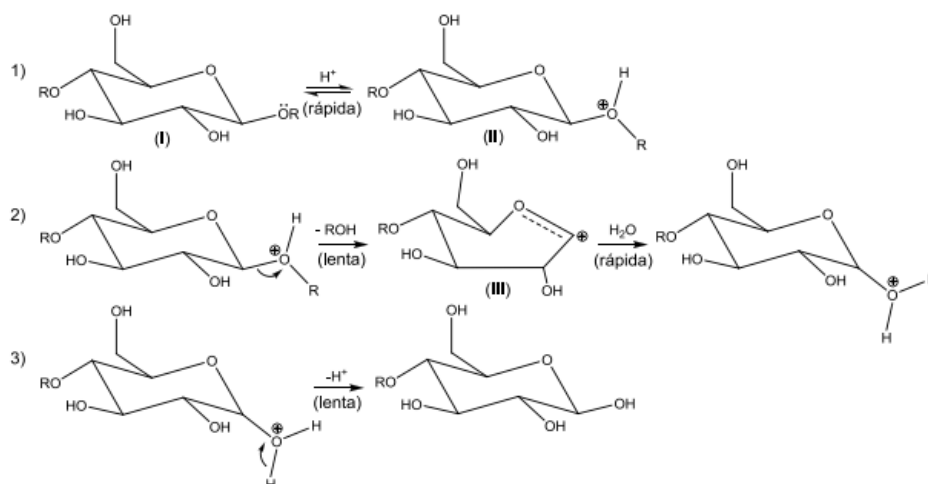
Para que a reação ocorra da maneira desejada é necessário um controle de temperatura e pressão adequadas à matéria prima. Ainda com o controle regular, o rendimento de glicose é limitado. Segundo Abassaeed (1987) na prática, o rendimento máximo dessa reação não passa de 50-60% quando realizada em batelada. O lado positivo de utilizar este ácido diluído é que não se faz necessária a etapa de recuperação de ácido, o que tornaria o processo com um custo bem mais elevado.

2.2.1. Hidrólise da Celulose

A celulose é um polímero linear formado por unidades β -D-glicopirranose juntas por ligações glicosídicas do tipo 1,4. Estas ligações estão sujeitas a hidrólise catalisada por ácidos (GURGEL, 2002).

Após estudos de muitos pesquisadores, o mecanismo principal de uma reação de hidrólise ácida foi elaborado por Fengel e Wengener (1984) conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1- Mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas da celulose.



Fonte: Fengel e Wegener (1984) *apud* Gurgel (2010)

A quebra das ligações glicosídicas se dá em três etapas. Inicialmente um próton de um catalisador ácido interage de forma rápida com o oxigênio glicosídeo que liga as unidades de β -D-anidroglicose (I), formando assim, o ácido conjugado (II). Em um segundo momento ocorre a quebra da ligação C-O deste ácido formando um íon carbônico cíclico que adota uma conformação de uma meia cadeira (III). No terceiro momento após uma adição rápida de água são liberados uma unidade de β -D-anidroglicose e um próton (XIANG, 2002).

O íon carbônico intermediário é formado mais rapidamente no final da cadeia polissacarídea do que no meio, assim o rendimento de monossacarídeos após a hidrólise parcial é maior do que o calculado com base em uma quebra aleatória das cadeias (FENGEL e WENGENDER, 1984 *apud* GURGEL, 2010).

2.2.2. Parâmetros e Fatores Primordiais para uma Boa Hidrólise Ácida

Mesmo conhecendo todo o mecanismo da reação de hidrólise em todo seu funcionamento básico e geral, alguns fatores são relevantes para que o rendimento da reação seja favorável, ou seja, para que tudo ocorra da maneira correta. Estes fatores estão ligados tanto ao ácido quanto a celulose.

Em relação ao ácido deve ser levado em consideração o tipo, a concentração e a força desse ácido. E ainda deve ser voltada a atenção à temperatura e pressão da reação.

Já relacionado à celulose deve ser estudado a fase que a reação irá ocorrer, se será heterogênea (ácido diluído) ou homogênea (ácido concentrado).

2.3. Método DNS para Identificação dos Açúcares Redutores

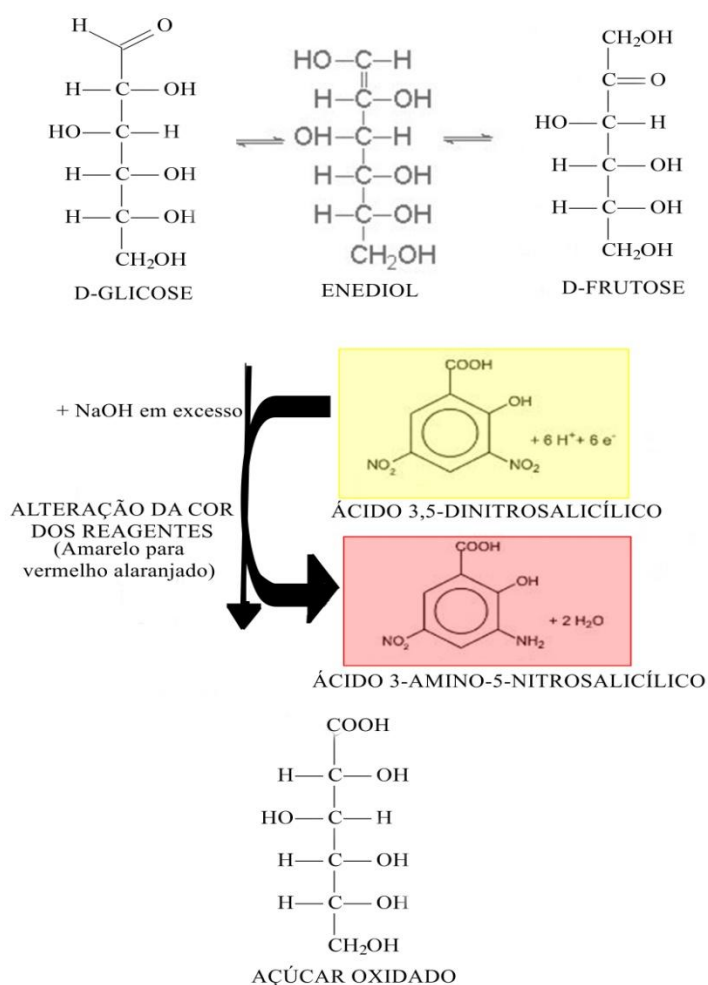
Deoti *et al* (2013) afirma que glicose e frutose são os principais carboidratos usados por leveduras para o processo de fermentação alcoólica. Por terem o carbono anomérico livre, ambos são ditos monossacarídeos. São classificados como açúcares redutores pelo fato de participarem de reações de óxido-redução como agente redutor.

Para determinação de açúcares são realizados testes baseados em reações de óxido-redução pelo grupo hidroxílico hemiacetalico do monossacarídeo, que pode reagir com íons e formar complexos coloridos (BOBBIO, 2005), ou ainda por reações coloridas por meio de condensação de produtos resultantes da degradação de açúcares em ácidos fortes com uma quantidade significativa de compostos orgânicos (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013).

O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (MALDONADE et al., 2013).

O esquema da reação do método DNS pode ser observado na Figura 2 a seguir.

Figura 2 - Esquema das reações envolvidas no Método DNS



Fonte: Adaptado de Maldonade *et al.*(2013)

2.4. Fermentação Alcoólica

A fermentação é uma sequência de reações químicas controladas por enzimas, onde uma molécula orgânica será degradada em um composto mais simples, ocorrendo liberação de energia.

2.4.1. Breve Histórico

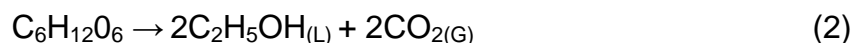
O homem utiliza fermentação alcoólica há mais de 4000 anos, quando os egípcios fabricavam pães e bebidas a partir de cereais e frutas. Entretanto, só recentemente que se foi possível relacionar fermentação com a levedura,

um fungo bem distribuído na natureza e com capacidade de sobreviver em condições tanto aeróbias quanto anaeróbias (LIMA *et al.* 2001).

Antonie van Leewenhoek foi o primeiro a notar a existência dessa levedura, após observar uma amostra de cerveja no seu microscópio. Ao passar dos anos outros cientistas passaram a observá-la e então foi visto o tamanho da importância biotecnológica desse organismo.

2.4.2. Agente da Fermentação Alcoólica

A levedura comumente utilizada para produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta é um microorganismo unicelular que se reproduz por brotamento e atua de forma enzimática sobre glicídios (açúcares, $C_6H_{12}O_6$, por exemplo), produzindo etanol (C_2H_5OH) e gás carbônico (CO_2), conforme equação (2):



Uma enzima, denominada *invertase* realiza uma etapa anterior ao processo de formação de açúcar em álcool. Essa enzima é responsável pela quebra das moléculas dos glicídios em moléculas mais simples (monossacarídeos). Em seguida, esses monossacarídeos são submetidos a outra enzima a *zymase* a qual produz o etanol.

Segundo Lima *et al.* (2001) é importante ressaltar que a levedura *Saccharomyces* é um aeróbio facultativo, sendo assim, possui uma habilidade de ajustar seu metabolismo de acordo com as condições que se encontra, tanto na ausência como na presença de oxigênio (anaerobiose e aerobiose).

O objetivo primordial da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros) e perpetuar a espécie. O etanol e o CO_2 resultantes se constituem, tão somente, de produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA *et al.*, 2001).

2.4.3. Principais produtos da fermentação

Além da formação de etanol e CO₂ as reações ocorridas no processo de fermentação induzem a formação e excreção de outros produtos, além da formação de biomassa devido ao crescimento da levedura.

Após estudos, alguns especialistas chegaram a conclusões sobre a formação desses produtos em uma proporção de 100 g de glicose metabolizada (Tabela 1), calculando o equivalente em açúcar consumido para a formação de cada um deles.

Tabela 1 - Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas.

PRODUTO DA FERMENTÇÃO	Pasteur 95%	Jackman 90-95%	Basso et al. 85-92%
Etanol	48,5	45,0-49,0	43,0-47,0
Gás carbônico	46,4	43,0-47,0	41,0-45,0
Glicerol	3,3	2,0-5,0	3,0-6,0
Ácido succínico	0,6	0,5-1,5	0,3-1,2
Ácido acético	-	0,0-1,4	0,1-0,7
Óleo fúsel	-	0,2-0,6	-
Butilenoglicol	-	0,2-0,6	-
Biomassa (massa seca)	1,2	0,7-1,7	1,0-2,0

Fonte: Lima *et al.* (2001)

2.4.4. Cuidados necessários na fermentação

2.4.4.1. Inóculo

Também chamado de pé-de-cuba, o inóculo é certo volume de suspensão de microorganismos em uma concentração capaz de garantir, de forma econômica a fermentação.

É de extrema importância tomar os devidos cuidados na preparação desse inóculo, uma vez que qualquer contaminação no mesmo virá a comprometer toda a produção. Schmidell (2001) cita que nesta fase de preparação, em processos aeróbios, o principal foco de contaminação é a injeção de ar fornecida ao sistema, onde esse ar deve ser sempre esterilizado.

2.4.4.2. Mosto

O meio onde ocorrem todas as reações e transformações na microbiologia recebe o nome de meio de cultura. Na área fermentativa esse meio recebe o nome de mosto. Como na preparação do inóculo, no mosto fermentativo cuidados com ph, temperatura, nível de oxigênio, entre outros, são essenciais para o bom desenvolvimento de todas as reações, pois proporcionam um bom desenvolvimento microbiano e uma boa formação do produto desejado, nesse caso o etanol.

Wang *et al.* (1979) sugere que a formação do mosto leve em consideração a composição celular, o requerimento energético e a necessidade de substâncias específicas para desenvolvimento do processo.

2.4.4.3. Temperatura

As leveduras são classificadas como mesófilas, ou seja, se adéquam a temperaturas próximas da temperatura ambiente, geralmente na faixa de 25 a 30 °C, chegando a 35 °C em escala industrial. Segundo Lima *et al.* (2001) à medida que a temperatura aumenta a velocidade da fermentação também aumenta, entretanto sobe também a facilidade de ocorrer contaminação bacteriana e a levedura se torna mais sensível à toxidez do etanol. Por isso é importante verificar e manter sempre controlada a temperatura na etapa de fermentação.

2.4.4.4. pH

A tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais (LIMA *et al.*, 2001)

Quanto maior a acidez maior será o rendimento de etanol, pois o meio mais ácido inibe o crescimento da levedura. Todavia, o pH adequado para fermentações alcoólicas está na faixa de 4 a 5, com substratos de alto poder tampão, ou seja, substratos que resistem a mudanças de ph. Pois, mesmo que a acidez ajude na produção de etanol, um meio ácido demais restringe o trabalho da levedura.

2.4.4.5. Inibidores da fermentação

Os próprios produtos da fermentação podem ser inibidores, como o etanol. Porém, além deste, diferentes substâncias presentes no mosto também podem vir a limitar o trabalho da levedura.

Lima *et al.* (2001) diz que alguns minerais como potássio e cálcio se apresentados em quantidades excessivas, geram efeitos negativos a fermentação.

Lima *et al.* (2001) identificou o alumínio como elemento estressante da levedura, em condições de fermentação industrial, acarretando queda simultânea da viabilidade e dos teores de trealose da levedura.

2.4.5. Fases da fermentação

O processo prático da fermentação se dá em três fases: a preliminar ou lag, tumultuosa e complementar.

Na fase preliminar ocorre o contato das leveduras com o meio. A sua principal característica é a multiplicação dessas leveduras, conseqüentemente o consumo de açúcar e o início da produção de etanol. A temperatura nessa fase aumenta e começa a ocorrer liberação de CO₂.

A fase tumultuosa se caracteriza pela intensa produção de álcool e liberação de CO₂. A aparência do mosto nessa fase é semelhante a um líquido fervendo devido o trabalho intenso das leveduras formadas. A temperatura, conseqüentemente, também se eleva e esta deve ser controlada por resfriamento.

Na fase complementar a liberação de gás diminui, sendo assim, agitação do mosto e temperatura diminuem. Nesta fase os açúcares se esgotam.

3. METODOLOGIA

Este estudo foi todo realizado no Laboratório de Tecnologia Sucroalcooleira, localizado no Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional – CTDR, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, extensão do campus I.

Inicialmente foi realizada a etapa de produção do etanol lignocelulósico, desde o preparo do bagaço de cana até o processo de micro destilação, e em seguida as análises de ART - através do método DNS -, e demais análises físico-químicas necessárias para controle e realização do processo de produção.

3.1. Bagaço de Cana

O bagaço de cana-de-açúcar, matéria-prima para o etanol produzido, foi fornecido pela Usina Japungu, localizada na zona rural da cidade de Santa Rita, Paraíba. O bagaço foi adquirido já triturado, mas, antes de seguir para as etapas de produção, o mesmo foi peneirado e pesado.

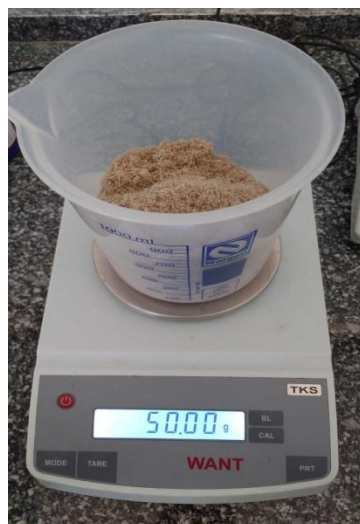
Após passar por peneira de 1 mm (Figura 3), com auxílio de um béquer e uma balança semi-analítica foram pesadas 50g de bagaço, como visto na Figura 4.

Figura 3 - Peneira quantitativa (1 mm)



Fonte: Autor (2016)

Figura 4 - Pesagem do bagaço.



Fonte: Autor (2016)

3.2. Pré-tratamento

Ao bagaço peneirado foram adicionadas 400 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 10%, e em seguida essa mistura ficou em repouso por três horas (Figura 5).

Estando o bagaço em contato com o ácido ocorre um processo de expansão, o que facilita a digestão na hidrólise. Este pré-tratamento também pode ser chamado de pré-hidrólise, pois prepara a biomassa para a etapa consecutiva.

Figura 5 – Biomassa em contato com o ácido, correspondente a etapa de pré-hidrólise.



Fonte: Autor (2016)

3.3. Hidrólise

Um sistema adaptado foi montado (Figura 6), onde a biomassa já pré-tratada foi submetida a banho Maria e agitação mecânica, para que ocorresse a reação de hidrólise.

O banho Maria serviu para aquecimento da biomassa, uma vez que a reação de hidrólise necessita de uma temperatura acima da ambiente para que ocorra com facilidade. Foi adaptado ainda um termômetro a fim de regularizar essa temperatura, para que não se excedesse o limite. A reação ocorreu de maneira mais eficiente quando biomassa estava exposta a temperaturas em torno de 35 - 40 °C.

A agitação mecânica foi utilizada para homogeneização da biomassa, a fim de que todo o bagaço presente fosse exposto ao ácido, assim, toda biomassa foi hidrolisada. Esse processo durou duas horas.

Figura 6 – Sistema adaptado para reação de hidrólise.



Fonte: Autor (2016)

3.4. Concentração ART

Durante o processo de produção foram retiradas alíquotas da biomassa em determinadas etapas, com o objetivo de analisar a concentração de açúcares redutores totais (ART) nessas amostras, verificando assim a eficiência dos procedimentos realizados.

As amostras foram retiradas em quatro etapas:

- a) Antes da hidrólise;
- b) Após a hidrólise;
- c) Antes da fermentação; e
- d) Após a fermentação.

A metodologia de análise desse açúcar foi elaborada pelo método colorimétrico utilizando DNS (Embrapa 2013). Este método baseia-se na reação entre açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, formando compostos amarelos ou alaranjados.

3.4.1. Determinação da curva padrão

Antes de analisar as amostras da biomassa foi necessária a elaboração de uma curva padrão, a fim de determinar a coloração em determinadas concentrações e assim realizar uma equação para as análises posteriores. Foram pesadas 0,1 g de glicose e em seguida dissolvida em 100 ml de água destilada em balão volumétrico. Após homogeneização vigorosa essa solução foi transferida para tubos de ensaio nas seguintes quantidades: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, conforme Figura 7. Em seguida, foi adicionada água destilada em todos os tubos para que todos ficassem com a quantidade de 10 ml.

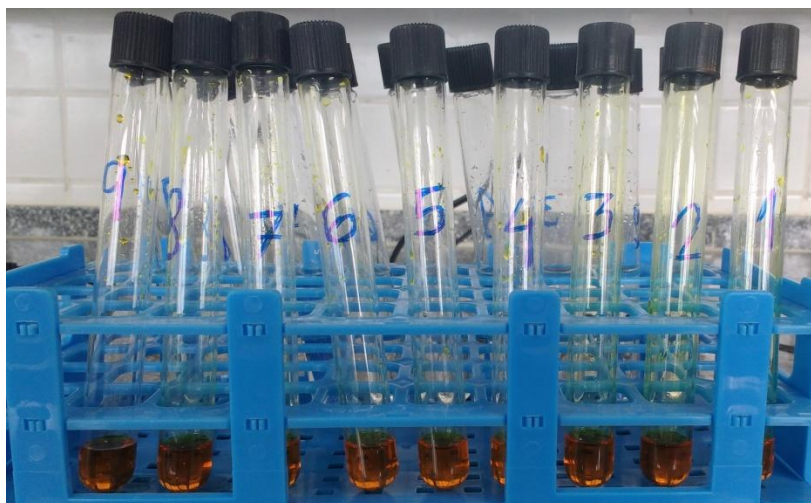
Figura 7 - Etapa inicial método DNS.



Fonte: Autor (2016).

Retirou-se 1 ml de cada tubo e levou a outros tubos com 1 mL de DNS (Figura 8), os quais foram levados a aquecimento em banho Maria a 100°C por cinco minutos. Uma observação importante nessa etapa é que os tubos não devem ser colocados no banho Maria antes que a água atinja os 100°C.

Figura 8 - Solução-mãe junto com o DNS.



Fonte: Autor (2016).

Após esfriar por mais cinco minutos em temperatura ambiente, completar novamente para 10 ml com água destilada e homogeneizar.

As amostras foram levadas ao espectrofotômetro modelo EEQ-9005 da Edutec e lidas a 540 nm, como pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 – Espectrofotômetro EEQ – 9005 – Edutec, utilizado para análise DNS das amostras.

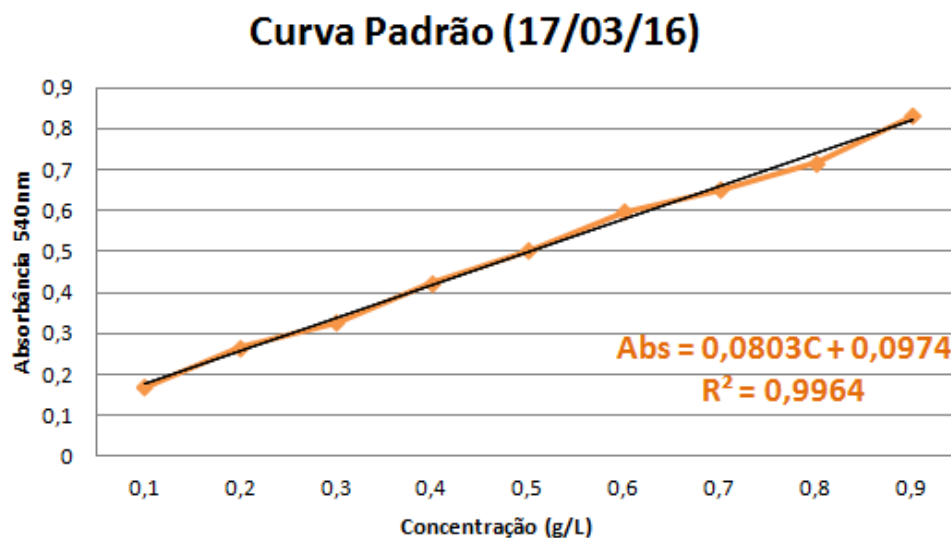


Fonte: Autor (2016).

Com o resultado das leituras do espectrofotômetro, foi elaborada uma tabela de concentração *versus* absorbância, e em seguida o gráfico que deu origem a curva de calibração (Figura 10). Com a curva elaborada foi possível

gerar a equação da mesma, que foi utilizada na etapa seguinte de análises das amostras da biomassa.

Figura 10 - Curva padrão para método DNS.



Fonte: Autor (2016)

3.4.2. Análise das amostras

Para análise da biomassa, é pesada 1 g de cada amostra e adicionada à 100 ml de água destilada (diluição 1:100). Agitou-se a amostra durante 30 minutos e em seguida levou à centrifuga por 10 minutos para separar o líquido da biomassa. A partir de então as etapas são idênticas ao que foi realizado para determinar a curva padrão. Um ml do líquido contido foi retirado e adicionado em um tubo com 1 ml de DNS, esse procedimento foi realizado em triplicata para melhor exatidão de análise. As amostras foram levadas a aquecimento por cinco minutos a 100 °C (Figura 11) e esfriadas, logo após, em temperatura ambiente. Completaram-se os tubos para 10 ml e levou para leitura a 540 nm em espectrofotômetro.

Figura 11 - Aquecimento dos tubos com amostras de biomassa reagidas com DNS para análise de açúcares redutores.



Fonte: Autor (2016).

3.5. Filtração a vácuo

Para que haja a fermentação é preciso extrair toda fração líquida possível da parte sólida, para isto foi utilizada filtração a vácuo.

O sistema contou com uma bomba de vácuo ligada, através de uma mangueira a um kitasato. Em um funil de porcelana foi colocado um filtro quantitativo responsável por conter toda parte sólida, deixando passar apenas o líquido. Essa estrutura pode ser visto na Figura 12 a seguir.

Figura 12 - Sistema de filtração a vácuo a fim de separar a biomassa líquida da sólida para obtenção do mosto.



Fonte: Autor (2016).

3.6. Correção do pH

Antes que a biomassa seja adicionada ao fermento para a etapa de fermentação, é necessário o ajuste do pH para que ele fique ideal para a levedura, em torno de 4,5 e 5,0. Uma vez que foi adicionado ácido sulfúrico o meio se encontra bastante ácido, para correção foi usado hidróxido de sódio (NaOH).

Em teste inicial, utilizou-se o hidróxido a 10%, assim como estava a concentração de ácido. Entretanto, essa proporção gerou uma quantidade de líquido muito alta, já que a concentração do hidróxido era baixa para a correção. Então, no final, a concentração de hidróxido utilizada para esta correção foi de 30%, utilizando cerca de 150 a 180 ml de NaOH.

É importante a relatar que a reação do ácido com o hidróxido é exotérmica, portanto é necessária a adição do produto alcalino aos poucos, a fim de aguardar a temperatura se estabilizar e ser feita a leitura correta do pH. Para esta fase utilizou-se o pHmetro e um termômetro, conforme Figura 13.

Figura 13 - Sistema de correção do pH.



Fonte: Autor (2016).

3.7. Preparo do inoculo

Com a biomassa pronta, é preciso preparar o fermento que irá recebê-la. Para preparo do inoculo foram utilizadas 20 g de levedura selecionada LNF CA-11 e 1,5 g de glicose, misturadas a 150 ml de água destilada. Tal mistura

foi aerada por uma hora com chumaço de algodão (Figura 14). Este método é utilizado para ativação das leveduras, para que, ao receber a biomassa eles já comecem a trabalhar imediatamente, facilitando o processo de conversão dos açúcares.

Figura 14 - Aeração do inóculo.



Fonte: Autor (2016).

3.8. Fermentação

Todo o processo de produção foi feito em duplicata, para que, ao chegar à etapa de fermentação houvesse dois mostos.

Os mostos fermentativos continham 600 mL de líquido do bagaço hidrolisado, em ambos foram adicionadas 90 mL do inóculo (equivalente a 15%). As fermentações aconteceram em frascos de vidro para facilitar a visualização desta etapa.

O mosto 1 foi deixado fermentar por 48 horas, sem injeção de ar. Já o mosto número 2, também fermentado por 48 horas, recebeu durante toda a etapa a injeção direta de ar (Figura 15). Sendo este o objetivo do estudo, comparar a eficiência da fermentação com e sem a injeção de ar.

Figura 15 - Etapa de fermentação. Mosto I: sem injeção de ar. Mosto II: com injeção de ar.



Fonte: Autor (2016).

3.9. Destilação

A destilação ocorreu em um micro destilador de bancada alimentado com 80 mL de vinho por vez, o que fez desta uma etapa demorada. Foi feita uma bidestilação a fim de purificar o produto final.

4. RESULTADOS E DISCURSSÕES

4.1. Concentração de ART

A concentração de ART durante o processo de obtenção do etanol de segunda geração é responsável por fazer o diagnóstico do mesmo. Apontando os momentos em que houve exposição dos açúcares, conseqüentemente um aumento destes. E identificando também, onde houve a diminuição dos açúcares, ou seja, em que etapa o açúcar foi consumido.

No estudo a concentração de ART foi verificada em quatro fases, em um total de seis amostras, pois a fermentação contou com dois mostos diferentes. As amostras retiradas foram submetidas à metodologia de análise por método DNS e lidas em espectrofotômetro. A Tabela 2 mostra os resultados de absorbância lidos a 540 nm.

Tabela 2 - Resultados de leitura de absorbância para amostras de alíquotas retiradas durante o processo.

AMOSTRA	ABS (540 nm)
Pré-hidrólise	0,153
Pós-hidrólise	0,506
Pré-fermentação (MOSTO 1, SEM AR)	0,357
Pré-fermentação (MOSTO 2, COM AR)	0,361
Pós-fermentação (MOSTO 1, SEM AR)	0,312
Pós-fermentação (MOSTO 2, COM AR)	0,249

Fonte: Autor (2016).

Para encontrar a concentração de açúcares nas amostras após a leitura no espectrofotômetro, os dados lidos foram jogados na equação 3, feita através da curva padrão anteriormente elaborada.

$$\text{Abs} = 0,0803C + 0,0974$$

(Equação 3)

Onde:

Abs= absorvância a 540 nm

C= concentração de açúcares em g/L

Os resultados de concentração podem ser vistos na Tabela 3 em seguida.

Tabela 3 - Concentração de açúcares em g/L.

AMOSTRAS	Concentração (g/L)
Pré-hidrólise	0,6
Pós-hidrólise	5,08
Pré-fermentação (MOSTO 1)	3,23
Pré-fermentação (MOSTO 2)	3,28
Pós-fermentação (MOSTO 1)	2,67
Pós-fermentação (MOSTO 2)	1,89

Fonte: Autor (2016).

Com base nos dados das Tabelas 2 e 3 apresentadas anteriormente, pode ser comprovada a eficiência da reação de hidrólise utilizando o ácido sulfúrico a 10 %, uma vez que, a quantidade de açúcares aumentou significativamente, ou seja, as quebras de lignina, celulose e hemicelulose ocorreram, e conseqüente os açúcares ficaram dispostos ao processo.

A fermentação ocorreu em duas situações, para que fosse observado o comportamento da levedura quando recebesse a injeção de ar. A fim de comparar no qual ela desenvolveria o melhor trabalho. Com base nas tabelas 2 e 3, a Tabela 4 mostra o resultado comparativo das duas situações, com e sem injeção de ar, em porcentagem, considerando a quantidade de açúcar consumido.

Tabela 4 - Comparativo da fermentação considerando o açúcar consumido.

SITUAÇÃO	CONSUMO DE AÇÚCAR (%)
----------	--------------------------

MOSTO 1 (sem injeção de ar)	17,4 %
MOSTO 2 (com injeção de ar)	42,37 %

Fonte: Autor (2016).

Os percentuais de açúcar consumido apresentados para mosto sem injeção de ar (17,4%) e mosto com injeção de ar (42,37%) identificam que a levedura se adaptou melhor no mosto 2, no qual houve injeção de ar, foi o mais propício para o trabalho da levedura pois nele ocorreu maior consumo de açúcar. Isto porque a levedura se multiplica na presença de ar, então, quanto maior o número de leveduras maior o consumo de açúcar.

É importante ressaltar que a fermentação em nenhuma dos dois mostos ocorreu com 100% dos consumos dos açúcares ou próximo disso devido aos tipos de açúcares presentes no mosto. O material lignolulósico em sua estrutura compõe açúcares C-6 (glicose, frutose) e C-5 (xilose), e a levedura utilizada neste estudo (*Saccharomyces cerevisea*) só fermenta açúcares de cadeia C-6. Para que a fermentação ocorra em 100 % nesse tipo de material é necessária a adição de uma levedura que fermente açúcares C-5, como as *Candida shehatae* e *Pichia stipitis*. Ou seja, a aplicação tecnologia mais avançada, utilizar a *Saccharomyces cerevisea* modificada geneticamente para realizar esta tarefa.

4.2. Álcool produzido

O teor alcoólico dos mostos foi medido por um Densímetro DA-130N portátil da Kioto (Figura 16), o qual suga uma pequena quantidade da amostra e apresenta o resultado no leitor. Os valores de teor alcoólico após bi destilação foram de 23 °GL para o vinho do mosto 1 e 27,8 °GL para o mosto 2.

Figura 16 - Densímetro digital portátil



Fonte: Autor (2016)

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos e discutidos, o objetivo de comparação do comportamento da levedura em mostos com condições de aeração diferentes foi realizado. Conclui-se que a levedura se adapta melhor ao mosto com injeção de ar, consumindo maior quantidade de açúcar e liberando mais etanol.

Apesar do grande número de pesquisas tecnológicas feitas e em execução, o desafio para produção de etanol lignocelulósico ainda é grande. Uma vez que, em escala laboratorial os resultados vêm sendo em grande maioria favoráveis, porém ao partir para a escala industrial algumas barreiras aparecem, e acabam por adiar cada dia mais a produção em grande escala desse etanol.

O desafio hoje é encontrar a metodologia adequada para que os resultados obtidos em escala industrial coincidam com os resultados da escala laboratorial, para isso, estudos de novas tecnologias estão sendo realizados diariamente. Pois, com uma usina de etanol lignocelulósico funcionando adequadamente, bagaço e palha de cana ganham um novo destino, reduzindo a quantidade de insumos da indústria sucroalcooleira e a economia do país tende a melhorar uma vez que será produzido mais etanol, sem a necessidade de novas áreas de cultivo, diminuindo as questões políticas de etanol *versus* combustível.

6. SUGESTÕES FUTURAS

- Produzir etanol lignocelulósico a partir da palha de cana e do mix palha mais bagaço;
- Buscar novas fontes para produção de etanol de segunda geração;
- Fazer estudo comparativo do etanol de resíduos da cana de açúcar com o etanol de outras fontes lignocelulósicas; e
- Realizar uma fermentação com a presença de outras leveduras, capazes de fermentar todo açúcar presente.

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E O BIOCOMBUSTÍVEIS-ANP. **Produção de Biocombustíveis. Etanol**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis>>. Acesso em: Agosto de 2016.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S. **Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation**. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 2012, p. 1-15. 2012.

DEOTI, J. R.; SANTOS, A. A.; JÚNIOR, S. L. A. **Nova metodologia de dosagem de açúcares redutores confere maior velocidade à análise de parâmetros de processos fermentativos**. 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984.

GURGEL, Leandro Vinícius Alves. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: Estudo cinético para sacarificação de celulose para produção de Etanol**. Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos. Departamento de Físico-Química. São Carlos, 2010.

KOLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil**. São Paulo, 2010.

LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia Industrial vol. 3/ Urgel de Almeida Lima – outros coordenadores: Eugênio Aquarone, Walter Borzani, Willibaldo Schmidell – São Paulo: Blucher, 2001.**

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS**. Embrapa, março de 2013.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; SCAMPARINI, A. R. P. **Carotenoids yeasts isolated from the Brazilian ecosystem**. Food Chemistry, London, v. 107, n. 1, p. 145-150, Mar. 2008.

NOVA CANA. **Matérias-primas do etanol de 2ª geração**. 2014. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/materias-primas/>>. Acesso em: Agosto de 2016.

PERLINGEIRO, Carlos Augusto G. **Biocombustíveis no Brasil: fundamentos, aplicações e perspectivas**. Synergia Editora, v. 1, n.1, 2014.

RAÍZEN. **Tecnologia em energia renovável: Etanol de segunda geração**. Disponível em: <<http://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em: Agosto de 2014.

RAMALHO, J. J. A.; GUARIEIRO, L. L. N.; VIEIRA, E. D. **Análise do Potencial de Uso da Fibrade Coco Verde (Cocus Nucifera) para Produção de Etanol de Segunda Geração**. Disponível em: <<http://www.revistas.uneb.br/index.php/gestecimc/article/viewFile/1924/1336>>. Acesso em: Agosto de 2016.

SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia Industrial vol. 2**/ Willibaldo Schmidell Urgel de Almeida Lima – outros coordenadores: Urgel de Almeida Lima, Eugênio Aquarone, Walter Borzani – São Paulo: Blucher, 2001.

XAVIER, Marcus Renato. **The brazilian sugarcane ethanol experience**. Issue Analysis, 15 de fevereiro de 2007.

XIANG, Q. **Conversion of lignocellulosic substrate into chemicals: kinetic study of dilute acid hydrolysis and lignin utilization**. 2002. 163 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Auburn, Alabama. 2002.